

Opponensi vélemény Bartók Tibor „Új fumonizin mikotoxinok azonosítása HPLC/MS módszerekkel” c. akadémiai doktori értekezéséről.

A fumonizinek a *Fusarium verticilloides* és a *F. proliferatum* penészgombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek mind állat-, mind humán-egészségügyi szempontból egyaránt jelentősek. A fumonizinek felfedezésük óta a mikotoxin kutatás élvonalába tartoznak, melyet igazol az a több ezer közlemény is, amely ez idő alatt a tudományos folyóiratokban megjelent. A fumonizin kutatás különösen aktuális és értékes területe az új fumonizinek azonosítása, izolálása és szerkezetük felderítése, ezért a jelölt témaválasztását mind elméleti, mind gyakorlati szempontból nagyon hasznosnak és aktuálisnak ítélek. Az új mikotoxinok keresése, kutatása véleményem szerint azért is indokolt, mert a gyakorlati állategészségügyi diagnosztikai munka során gyakran találkozunk olyan kórképekkel, melyekről azt valószínűsítjük, hogy háttérükben eddig még nem ismert, új mikotoxinok lehetnek.

A Jelölt az értekezés téziseit 38 tudományos közleményére, kéziratra és konferencia kiadványra alapozza. Az MTMT adatbázisa szerint ezeknek a tudományos közleményeknek az összesített impakt faktora 36.558; a közleményekre 291-en hivatkoztak. Ezek az adatok a Jelölt kiemelkedő tudományos aktivitására utalnak.

A 152 oldalas értekezés felépítése követi a doktori értekezések megszokott szerkezetét. Az egységes szerkezetű alkotás a következő részekre tagolódik:

- 2 oldal jól követhető, az értekezésben eligazodást nyújtó *tartalomjegyzék*.
- A nagy precizitással összeállított *rövidítések jegyzéke* 3 oldalt tesz ki, ami megkönnyíti az olvasó dolgát az értekezésben gyakran szereplő, nagyszámú kémiai elnevezés közti eligazodásban.
- A *bevezetés és célkitűzések* 3 oldalt tesznek ki, melyben a szerző összefoglalja kutatási témájának jelentőségét. A kutatás célkitűzéseit 7 pontban fogalmazza meg. A jól megválasztott, logikusan felépített célkitűzés már előre vetíti a kutatómunka eredményességét.
- A Jelölt 36 oldalon foglalja össze az *irodalmi áttekintés* című fejezetben a fumonizinekkal kapcsolatos tudományos ismereteket. Az irodalmi adatoknak logikus rendszerbe foglalása, ésszerű tagolása jól megalapozza a kutatások célkitűzéseit. Az irodalmi adatok kellő részletességgű, naprakész ismertetése megfelelő háttérrel nyújt kutatásainak. A Szerző ebben a fejezetben 283 közleményre való hivatkozással ismerteti a fumonizin kutatás fontosabb

területeit, melyek a következők: fumonizineket termelő gombafajok, *in vivo/in vitro* termelés/termeltetés, bioszintézis és genetikai szabályozása, a minőségi és mennyiségi meghatározásukra alkalmazott analitikai eljárások, szerkezetazonosítás, toxicitás vizsgálat, metabolizmus kutatás, élelmiszerbiztonsági szabályozás. Az ismeretanyag megértését segíti az igényesen kivitelezett ábrák és az áttekintést segítő, jól felépített táblázatok (7 ábra és 4 táblázat). A bíráló ebből a fejezetből egyebek között kiemelésre méltónak tartja „*A fumonizinek bioszintézise és a bioszintézis genetikai szabályozása*” című alfejezetet, melyben a szerző összegzi azokat a legutóbbi időben született ismeretanyagot, melyek kellő részletességgel mutatják be a fumonizin termelődés genetikai hátterét. A fumonizinek minőségi és mennyiségi meghatározását ismertető kitűnő összefoglaló a szerzőnek az analitikai munkában való nagyfokú jártasságára utal, ami biztosítékot jelent kutatási témájának magas szintű megoldására.

- A Jelölt 9 oldalon ismerteti az *anyagok és módszerek* című fejezetben a kutatásai során felhasznált anyagokat és az alkalmazott vizsgálati módszereket. Az egész ország területéről gyűjtött növényi és egyéb mintákból izolált 60 *F. verticilloides* izolátum szolgált a fumonizinek *in vitro* termeltetéséhez. A gombákat rizs szubsztráton inkubálták és ezeket a tenyészeteket használták az ismert, valamint az újonnan azonosított fumonizinek meghatározására, ill. azonosítására. Az izolátumok széles körű elterjedtsége kellő alapot nyújt a toxinprofil kialakításához. Mazsola- és vöröshagymamintákról *Aspergillus* fajokat izoláltak, majd taxonómiai és genetikai vizsgálatokat végeztek. A mazsola- és vöröshagymaminták, valamint az *Aspergillus* izolátumok táptalajon termelt fumonizin-tartalmát meghatározták. A fumonizinek minőségi és mennyiségi meghatározása során két HPLC/ESI-ITMS készüléket és HPLC/ESI-TOFMS készüléket használtak. A HPLC/ESI-ITMS készülékekkel nagyérzékenységben, scan üzemmódban CID-MS tömegspektrumokat készítettek. Ezek a műszerek kiválóan alkalmasok a kis mennyiségben jelenlévő fumonizin analógok azonosítására. A HPLC/ESI-TOFMS készülékkel nagy pontosságú tömegmérést végeztek. Ezeknek a készülék típusoknak a kombinált alkalmazása ideális módszer új vegyületek azonosítására. A kutatás első 4 évében a HPLC elválasztás meredekebb grádiens módszerrel történt, majd a későbbiekben isomerek elválasztására kifejlesztett HPLC oszlopon, kevésbé meredek grádiens program alkalmazása lehetőséget adott további új fumonizinek azonosítására.

- A Szerző 68 oldalon az *eredmények és megvitatásuk* fejezetben ismertette a vizsgálatok eredményeit és vetette össze azokat az irodalmi adatokkal. Mind 60 *F. verticilloides* gombatorzs széles mennyiségi tartományban termelt fumonizineket. Az FB₁₋₄ mennyisége

alapján a jelölt meghatározta a fumonizin profilt. 55 törzs esetében a toxinprofil a következő volt: $FB_1 > FB_2 > FB_3 > FB_4$, 3 törzs esetében $FB_1 > FB_3 > FB_2 > FB_4$, míg két törzs toxinprofilja az előzőektől lényegesen eltért: $FB_2 > FB_4 > FB_1 > FB_3$. Ezek az eredmények összhangban vannak az irodalmi adatokkal. Magyarországon ez az első olyan vizsgálat, amely különféle termőhelyekről és szubsztrátokról izolált *F. verticilloides* izolátumok fumonizin-termelőképességét vizsgálta, és az eredmények alapján javasolta a fumonizin kemotípus elnevezés bevezetését. A kutatómunka első fázisában, a meredekebb grádienssel történő elválasztással 45 nemzetközi mércével is új fumonizint sikerült azonosítani, ezek közül 22 FB analóg, 2 FA analóg, 5 FC és FD analóg és 16 FBX analóg volt. Ezek közül jelentőségükben az FBX analógok emelkednek ki. Ebbe a csoportba olyan fumonizinek tartoznak, melyeken a fumonizin vázon lévő OH-csoportok nem TCA-val, hanem a citrát-körben szereplő egyes karbonsavakkal (cisz-akonitsav, AA; oxálborotjánkősav, OSA; oxálfumársav, OFA) képeznek észtereket. Ennek az a jelentősége, hogy ezzel a Szerző igazolta, hogy a fumonizin-képződés során a TCA prekursorai a citrát-körben termelődő karbonsavak. A kutatómunka másik fázisában kevésbé meredeken emelkedő grádiens és nagy elválasztóképeségű oszlop alkalmazásával a korábbinál jóval nagyobb hatékonyságú elválasztást sikerült megvalósítani, így további új fumonizineket azonosított. Ezzel a módszerrel 28 új FB_1 izomert azonosított, melyek közül a 28-as számú izomer azonosnak bizonyult a mások által a későbbiekben izolált és FB_6 -nak elnevezett komponenssel. A Szerző a széles retenciós idő tartományból – nagyon helyesen – azt a következtetést vonja le, hogy az acil-csoportok nemcsak a C-14 és a C-15 atomokon találhatók. Ennek igazolása az izolálást követő NMR vizsgálatokkal lehetséges. E módszer alkalmazásával további 22 új FB_5 izomert is azonosítottak. A tag retenciós idő tartomány alapján feltételezik, hogy egyes FB_5 izomerek esetében is a TCA molekulák nemcsak a C-14 és a C-15 molekulákon elhelyezkedő OH-csoportokat észtereszítik. Az értekezés nemzetközileg is legjelentősebb eredményei a három acil-csoportot tartalmazó fumonizinek azonosítása. Ezek a komponensek nagy molekulatömegű és erősen apoláros vegyületek, melyek FB_1 -nek palmitinsavval, linolsavval és olajsavval képzett észterei, ill. ezek izomerjei. A Szerző ezeket a komponenseket észterezett FB_1 toxinoknak (EFB_1) nevezte el. Ezeknek a fumonizineknek az azonosítása azért kiemelkedően nagy jelentőségű, mert ezek a vegyületek az FB_1 -nél sokkal apolárisabbak, ezért nagyobb arányban felszívódva nagyobb biológiai aktivitásúak lehetnek. A szerző kutatómunkájának ebben a fázisában egy új FP analógot (FP_4) és 4 új FP izomert is azonosított. Bár az FP analógok a többi fumonizinhez képest kevésbé toxikusak, jelentőségük abban áll, hogy ezek az adatok további információkat szolgáltathatnak a fumonizinek képződéséhez. Hét *Aspergillus niger* és/vagy *A. awamori*

fajokkal fertőzött mazsola fumonizin-tartalmát határozták meg. A minták átlagos FB-tartalma 7,22 mg/kg volt, egy mintában nagyon magas értéket mértek (35,5 mg/kg). A vizsgálatok során egyebek között azonosították a 28-as sz. FB₁ izomert is, melyet mások *A. niger* tenyészetéből izoláltak és FB₆ toxinnak nevezték el. 30 *A. niger* és *A. awamori* izolátum táptalajon történő fumonizin-termelését is vizsgálták. Az izolátumok 80 ill. 53.3 %-a átlagosan 5,16 mg/kg fumonizint termelt. A fumonizinek közül az FB₂ és az FB₄ volt a domináns toxin, de az izolátumok többsége FB₁ toxint, egy izolátum pedig FB₃ toxint is termelt. Ezek az adatok jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal. Hat – feketepeneszses rothadás tüneteit is mutató – vöröshagyma fumonizin-szennyezettségét is meghatározták, melyek közül 2-ben viszonylag kis mennyiségben (0.32 és 0.33 mg/kg) detektáltak fumonizineket. Vöröshagyma fumonizin-szennyezettségét a világon elsőként igazolták.

Az értekezésben ismertetett eredmények közül tudományos szempontból új eredményeknek az alábbiakat emelem ki:

1. A jelölt 60 *F. verticilloides* izolátumot rizsen elszaporítva fumonizint termelt, az FB₁₋₄ tartalom alapján megállapította az FB₁₋₄ toxinprofil. Az eltérő FB₁₋₄ toxinprofilok alapján javasolta a fumonizin kemotípus elnevezést. A gombatörzsek három kemotípusba sorolhatók.
2. A kiválasztott rizstenyészet HPLC/ESI-ITMS vizsgálatával 41 új fumonizint és fumonizin izomert azonosított, közöttük olyan komponenseket is, amelyeknél a fumonizin vázon lévő OH csoportot nem TCA, hanem egyéb szerves sav észteresít. Ebbe a csoportba 16 új fumonizin tartozik, ezeket a jelölt FBX-nek nevezte el. Az FBX típusú fumonizinek azonosításával először igazolta a TCA csoportok citrát-ciklus eredetét.
3. A fumonizin izomerek elválasztására a jelölt a korábban közöltekénél hatékonyabb módszert dolgozott ki, melynek alkalmazásával az FB₁ és az FB₅ toxinok 28 ill. 22 izomerjét választotta el, melyeket ESI-ITMS és ESI-TOFMS eljárásokkal azonosított.
4. A jelölt által kidolgozott analitikai módszerrel 6 új, apoláris tulajdonságú fumonizint azonosított. Megállapította, hogy ezeknek a komponenseknek a szerkezete az FB₁-éhez hasonló, azzal az eltéréssel, hogy szénláncukon harmadik acil-csoport (palmitil, linolil, oleil) is található. Ezeket a komponenseket a Szerző észterezett FB₁ (EFB₁) toxinoknak nevezte el. Az EFB₁ komponensek az apoláris jelleg miatt feltételezhetően nagyobb biológiai aktivitással rendelkeznek.

5. *Aspergillus* fajok által fertőzött mazsola- és vöröshagymamintákban mutattak ki fumonizin-szennyezést, amely egy újabb élelmiszerbiztonsági kockázatra hívja fel a figyelmet.
6. A Szerző *in vivo* és *in vitro* mintákból nyert kivonatban először mutatta be a 3-*epi*-FB₄ és az FB₄ toxinok HPLC elválasztását.
7. A jelölt vizsgálataival igazolta, hogy az *A. awamori* is képes *in vivo* és *in vitro* fumonizineket szintetizálni.

Az értekezés formailag teljesen megfelel az MTA doktori értekezéssel szemben támasztott követelményeknek. A dolgozat témaválasztása aktuális és rendkívül fontos kutatási terület. Az alkalmazott módszerek nagyon modernnek és nemzetközileg mérve is kiemelkedő színvonalúak. Az eredményekből levont következtetések helytállóak. A dolgozat külön értéke a logikus gondolatmenet, a szerkezeti részek jó tagolása, a világos és pontos megfogalmazás, a nagyszámú, igényesen kivitelezett ábra és táblázat, valamint a rendkívül informatív HPLC-kromatogramok és CID-MS spektrumok. Az értekezésben előforduló néhány gépelési hiba (pl. egyes mondatrészek megismételt gépelése egy mondaton belül a 63. és 64. oldalakon) a mondanivaló megértését nem zavarja.

A bírálókat során az alábbi kérdések fogalmazódtak meg.

1. A jelölt a fumonizin-termeltetéskor rizs szubsztrátot használt. A fumonizin-szennyezettség természetes körülmények között a kukoricában a leggyakoribb, míg a rizs természetes szennyezettségéről keveset tudunk. Mi indokolta a rizs szubsztrát alkalmazását és ez befolyásolhatta-e az új fumonizinek termelődését összehasonlítva a kukorica szubsztráttal?
2. A Szerző két táblázatban is közölte az FB₁ CID-MS spektrumát (7. és 14. táblázatok). A fragmensek tömegszámai a tömegspektrumokban megegyeznek, míg az intenzitás arányokban – különösen a 704; az 546; az 510 és a 334 *m/z* értékű fragmensek esetében - nagy eltérések vannak. Az ITMS-sel nyert CID-MS spektrumok az ionizáció adott körülményei között mennyire reprodukálhatók, illetve mivel magyarázhatók az intenzitás arányok jelentős eltérései ?
3. A mazsolaminták fumonizin-tartalmának meghatározásakor vizsgálták az FB₁ és az FB₂ visszanyerési értékét, ami 59,4 ill. 54,3 % volt, míg vöröshagymánál az FB₁ visszanyerése 93,7 és 96,7 %, az FB₂-é pedig 90,4 és 99,4 % volt. Mivel magyarázható a mazsolánál kapott viszonylag alacsony visszanyerési érték?

4. Az értekezés 99. oldalán a jelölt közli „A TOFMS mérések következtében egyértelművé vált, hogy az EFB₁ izomerek MS² spektrumában található hat fragmension csoportból a 4., 5. és 6. a fumonizin vázon található harmadik acil-csoport következménye.” Ugyanakkor azt is írja: „az EFB₁ izomerek fragmentációs mintázatában található 4., 5. és 6. fragmension csoportok *m/z* értékei találhatók az FB₁ toxin fragmentációs mintázatának fragmension csoportjaiban is.” A kérdésem a következő: a 4., 5. és 6. fragmension csoport a harmadik acil-csoport következménye, vagy az FB₁ fragmension csoportjaival azonos?
5. Az EFB₁-típusú fumonizinek FB₁ toxinhoz viszonyított relatív mennyisége 0.003-0.036 % között volt. Megítélése szerint a jelenlegi rutin analitikai módszerekkel ezek a komponensek az átlagos fumonizin-szennyezettségű kukoricában kimutathatóak lennének-e, amennyiben természetes körülmények között is hasonló arányban termelődnének?
6. A kutatások során a fumonizin-tartalmú tenyészetben nagyszámú új fumonizin analóg, illetve izomer került azonosításra. Véleménye szerint mi lehet az oka annak, hogy a fumonizinek bioszintézisekor ilyen nagyszámú, de kis mennyiségű fumonizin, ill. fumonizin izomer keletkezik?

Összefoglalva: kérdéseim a munka lényegét nem érintik és semmit sem vonnak le az értekezés tudományos értékeiből. Bartók Tibor doktori munkájában nemzetközileg is kiemelkedő, új tudományos eredményekről számolt be és ezzel hozzájárult a tudomány továbbfejlődéséhez. Munkája során értékes módszereket fejlesztett ki az új fumonizinek elválasztására és azonosítására, melyekkel nagyszámú új fumonizint azonosított.

A doktori értekezés tudományos eredményeit az MTA doktori cím megszerzéséhez elegendőnek tartom, javaslom a nyilvános vita kitűzését és sikeres védelem esetén az MTA doktori cím odaítélését ajánlom.

Budapest, 2012-11-26

Dr. Fazekas Béla PhD